

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-182695

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月7日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I
C 0 7 K 5/083		C 0 7 K 5/083
A 6 1 K 38/00	ABD	5/09
	ADY	5/093
C 0 7 K 5/09		17/08
5/093		17/10

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-351475	(71) 出願人	000215958 帝國製薬株式会社 香川県大川郡大内町三本松567番地
(22) 出願日	平成8年(1996)12月27日	(72) 発明者	藤井 尊 鳴門市鳴門町高島字南13番地の1
		(72) 発明者	横山 英輝 徳島市中常三島町2丁目17番地
		(72) 発明者	濱本 英利 徳島県板野郡北島町太郎八須字新堀27番地 2
		(74) 代理人	弁理士 小谷 悦司 (外2名)

(54) 【発明の名称】 g p 120に対して親和性を有するペプチド

(57) 【要約】

【課題】 ヒト免疫不全ウイルスの最外殻を構成する g p 1 2 0 分子に対して親和性を有するペプチドを提供する。

【解決手段】 式(1): H-A1-A2-A3-R  
(式中、Hは 水素原子を示し、A1は、アスパラギン酸、リジン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、セリン、メチオニン、システイン、トレオニン、イソロイシン、またはグリシンの残基、A2は、バリン、アスパラギン酸、トリプトファン、リジン、フェニルアラニン、イソロイシン、またはロイシンの残基、A3は、リジン、バリン、アスパラギン酸、アルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、トレオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、セリン、またはシステインの残基、Rは、カルボキシル基由来のOHまたは酸アミド由来のNH<sub>2</sub>である)で表される g p 1 2 0 に対して親和性を有するペプチドである。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(1):  $H-A1-A2-A3-R$   
(式中、

Hは 水素原子を示し、

A1は、アスパラギン酸、リジン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、セリン、メチオニン、システイン、トレオニン、イソロイシン、またはグリシンの残基、

A2は、バリン、アスパラギン酸、トリプトファン、リジン、フェニルアラニン、イソロイシン、またはロイシンの残基、A3は、リジン、バリン、アスパラギン酸、アルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、トレオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、セリン、またはシステインの残基、Rは、カルボキシル基由来のOHまたは酸アミド由来のNH<sub>2</sub>である)で表されるgp120に対して親和性を有するペプチド。

【請求項2】 式(2):  $A1'-A2-A3-R$   
(式中、

A1'は、アスパラギン酸、リジン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、セリン、メチオニン、システイン、トレオニン、イソロイシン、またはグリシンの残基、若しくは該アミノ酸を始端としてそのN末端側に任意のアミノ酸が配列したポリペプチド残基、A2、A3、およびRは前と同じ意味)で表されるgp120に対して親和性を有するペプチド。

【請求項3】 式(3):  $H-A1-A2-A3'$   
(式中、

A3'は、リジン、バリン、アスパラギン酸、アルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、トレオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、セリン、またはシステインの残基、若しくは該アミノ酸を始端としてそのC末端側に任意のアミノ酸が配列したポリペプチド残基、

H、A1、およびA2は前と同じ意味)で表されるgp120に対して親和性を有するペプチド。

【請求項4】 A1-A2-A3のアミノ酸配列を有することを特徴とするgp120に対して親和性を有するペプチド。

【請求項5】 請求項1~4のいずれかに記載のペプチドに、官能基を有する高分子化合物および/または医薬活性物質が結合した化合物または医薬として許容されるその塩類。

【請求項6】 請求項1~4のいずれかに記載のペプチドまたは医薬として許容されるその塩類、並びに薬学的に許容される担体及び/又は医薬活性物質を含有する組成物。

【請求項7】 請求項1~4のいずれかに記載のペプチドを含有するgp120に対する親和剤。

【請求項8】 請求項5に記載の化合物または医薬とし

て許容されるその塩類を含有するgp120に対する親和剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus: HIV)の最外殻を構成するgp120分子に対して親和性を有するペプチドに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】HIV感染症に対する治療法としては、主に化学療法が用いられており、ヌクレオシド誘導体である3'-azido-2',3'-dideoxythymine (AZT)が繁用されている。AZT投与による化学療法によって、HIV感染者の延命効果は顕著に見られたが、化学療法自体に起因する様々な問題は依然として回避されていない。即ち、第1に、長期投与により慢性毒性が現れること、第2に、治療中に薬剤耐性HIV株が出現すること、第3に、延命効果が見られた患者に悪性腫瘍が多発すること、第4に、治療の最終目的である免疫応答の回復は得られないこと、第5に、治療効果のモニター方法がないこと、等である。この様に化学療法は、HIV感染を根本的に治療し得る治療法とはなり得ないことから、最近の研究動向としては、HIVワクチンの開発に傾きつつある。

【0003】一般にワクチンと言えば、ウイルスなどの微生物を化学処理することによりその構造を変化させることなく不活性化したもの(不活性化ワクチン)や、病原性を失った弱毒株や天然痘ウイルスに対する牛痘ウイルス等の様に、ヒトに致死的作用を及ぼさない類似株(生ワクチン)を使用していた。しかしながら、HIVそのものは、本来弱毒株であるにもかかわらず、宿主細胞に侵入すると長期間滞在し得、次第に該宿主細胞の機能を破壊するようになることが知られており、且つHIVがターゲットとする宿主細胞が、免疫機能を司るリンパ球であること;更に、HIVが凍結乾燥血液製剤を介して血友病患者に蔓延したこと等を考慮すれば、不活性化・弱毒化のいずれの途を選択するにせよ、HIVそのものをワクチンに用いることは安全性の面で問題が多い。

【0004】従って、HIVワクチンの開発に当たっては、ウイルス最外殻の一部を使用するペプチドワクチンを作製することにより、感染を防止するのが理想的である。この様な観点から、多くの研究者がウイルス最外殻を構成するgp120分子のエピトープ解析を行っており、その結果、上記gp120分子のエピトープとして、V3領域(3rd hypervariable region)と呼ばれる非常に変異の激しい部位が、その主たる領域であることが解明された(Palker T.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2709-2713, 1988; Rusche J.R., et al., ibid 85: 3198-3202, 1988; Goudsmit J., et al., ibid 85: 4478-4482, 1988; Matsushita S., et al., J

Virol. 62: 2107-2114, 1988)。次いで、この領域の一部を用いたペプチド抗原を作製し、猿を用いたHIV感染阻止実験(Emini E.A., et al., Nature 355: 728-730, 1992)が行われたが、有効な臨床結果はまだ報告されていない。

【0005】更に、上記ペプチド抗原の抗原性を高める工夫もされている(Tam et al., 特表平3-503539号)が、V3領域などのエピトープとして好適なV領域の大部分は、変異や欠失が頻繁に生じることから、所望とするワクチンを得るには至っていない。

【0006】一方、V3領域の一部を抗原として使用するHIV中和抗体の開発も行われている。例えば特願昭63-171385号公報には、上記領域の部分ペプチドを抗原として用い、マウスでモノクローナル抗体を作製し、そのFab'をタンパク質レベルで或いは遺伝子工学的手法により結合させて、最終的にヒト抗体分子とマウス抗体分子をハイブリッドした抗HIVキメラ抗体を作製する方法が報告されている。しかしながら、この様にして得られた中和抗体にしても、実験室株レベルのものに過ぎず、実用上、有用な中和抗体は未だ得られていないのが現状である。この様に、HIV治療剤の開発を目的として、ワクチンや中和抗体を作製する研究が盛んに行われているが、未だ有用な治療剤は得られていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記事情に着目してなされたものであり、その目的は、HIVの最外殻を構成するgp120分子に対して親和性を有するペプチドを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決することのできた本発明のペプチドとは、

式(1):  $H-A1-A2-A3-R$

(式中、Hは 水素原子を示し、A1は、アスパラギン酸、リジン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、セリン、メチオニン、システイン、トレオニン、イソロイシン、またはグリシンの残基、A2は、バリン、アスパラギン酸、トリプトファン、リジン、フェニルアラニン、イソロイシン、またはロイシンの残基、A3は、リジン、バリン、アスパラギン酸、アルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、トレオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、セリン、またはシステインの残基、Rは、カルボキシル基由来のOHまたは酸アミド由来のNH<sub>2</sub>である)で表されるgp120に対して親和性を有するペプチドであるところに要旨を有するものである。

【0009】すなわち、本発明のペプチドは、上記A1、A2およびA3からなる3個のアミノ酸配列を基本構成とするペプチドであり、この様なアミノ酸配列を含むペプチドは、全て本発明の範囲内に包含される。従っ

て、

式(2):  $A1'-A2-A3-R$

(式中、A1'は、アスパラギン酸、リジン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、セリン、メチオニン、システイン、トレオニン、イソロイシン、またはグリシンの残基、若しくは該アミノ酸を始端としてそのN末端側に任意のアミノ酸が配列したポリペプチド残基、A2、A3、およびRは前と同じ意味)で表されるgp120に対して親和性を有するペプチドや、或いは、

式(3):  $H-A1-A2-A3'$

(式中、A3'は、リジン、バリン、アスパラギン酸、アルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、トレオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、セリン、またはシステインの残基、若しくは該アミノ酸を始端としてそのC末端側に任意のアミノ酸が配列したポリペプチド残基、H、A1、およびA2は前と同じ意味)で表されるgp120に対して親和性を有するペプチドも、全て本発明の一態様であると言えることができる。

【0010】また、上記ペプチドに、官能基を有する高分子化合物及び/又は医薬活性物質が結合した化合物または医薬として許容されるその塩類も本発明の範囲内に包含される。尚、これらのペプチドや化合物を含有するものは、換言すれば、gp120に対する親和剤と呼ぶことができる。

【0011】更に、本発明では、上記ペプチドまたは医薬として許容されるその塩類、並びに薬学的に許容される担体及び/又は医薬活性物質を含有する組成物も包含される。

【0012】尚、本発明に用いられる「ペプチド」には、ペプチドのC末端がCOOHであるものの他、酸アミドになっているものも含み、また、結合するアミノ酸の数にしても、特に明記しない限り、アミノ酸数が10個以下のオリゴペプチドから、それ以上のポリペプチドまで包含するものとする。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明者らは、従来のHIV治療剤は、ワクチンにしても中和抗体にしても、実用レベルの成果が何ら得られなかった理由として、免疫系の中心をなす抗体の認識できる、HIV最外殻を構成するgp120のエピトープの殆どが、変異の激しいV領域であることにその最大の問題があるという観点から、抗体に代わって、gp120に親和性を有するペプチドを得ることに着目し、鋭意検討した結果、所定のアミノ酸配列からなるペプチドを見出し、本発明を完成したのである。

【0014】尚、本発明における「親和性」とは、静電力や、水素結合、Van der Waals 力などの共有結合以外の弱い相互作用が合わさった特異的な強い結合を表す。

本発明のペプチドは、上記の様に構成されており、基本的には、式(1)： $H-A1-A2-A3-R$ （式中、 $A1$ 、 $A2$ 、 $A3$ および $R$ は前と同じ意味）で表される3個のアミノ酸残基からなるペプチドである。これらのペプチドは、この様に独立したペプチドであっても良いし、或いはポリペプチド中に、式(2)： $A1'-A2-A3$ や、式(3)： $H-A1-A2-A3'$ （式中、 $A1'$ 、 $A2$ 、 $A3$ 、 $A3'$ は前と同じ意味）のアミノ酸配列が、この順序でN末端側から配されたものであっても構わない。勿論、そのなかには、 $A1'-A2'-A3'$ がこの順序で繰り返し配してなるペプチドも含まれる。要するに、上述した3個のアミノ酸残基からなるペプチドを含むgp120に対して親和性を有するペプチドは、全て本発明の範囲内に包含されるのである。

【0015】本発明のペプチドは、固相合成法などの公地の方法により製造することができる。例えば、 $A1-A2-A3$ からなるペプチドを作製する場合、 $A3$ がリジン残基の場合は、N-保護リジンのカルボキシル基を直接、或いはカルボキシル基と結合し得る官能基及び該カルボキシル基を有するスパーサーを介して、アミノ基を有する不溶性樹脂に結合させた後、 $A2$ から $A1$ までの各保護アミノ酸を固相合成法により順次結合させ、次いで、上記不溶性樹脂およびアミノ酸の保護基を脱離させることにより、所望のペプチドを得ることができる。尚、 $A3$ のアミノ酸残基のカルボキシル基末端は、フリー（即ち、 $R$ が $-OH$ に相当）であっても良いし、或いは酸アミド（即ち、 $R$ が $-NH_2$ に相当）に変換されていても良い。また、 $A3$ のカルボキシル基末端は、必要に応じて該カルボキシル基に結合しているスパーサーのカルボキシル基と共に、合成高分子や生体高分子等、官能基を有する繁用の高分子化合物と結合しても良い（後記する）。尚、上記固相合成法に使用されるアミノ酸は、共通してL体であっても良いし、或いは共通してD体であっても構わない。

【0016】上記の場合において、固相合成法に使用される不溶性樹脂としては、そのアミノ基を介してC末端のN-保護リジンのカルボキシル基、または該カルボキシル基に結合しているスパーサーのカルボキシル基と結合可能であり、しかも結合後に脱離可能なものであれば制限されず、例えば、アミノメチル樹脂（アミノメチル化スチレン-ジビニルベンゼン共重合体など）、ベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドロキシリルアミン樹脂、アミノメチルフェノキシメチル樹脂、ジメトキシベンズヒドリルアミン（DMBHA）樹脂、およびこれらの誘導体などが挙げられる。このうち、ベンズヒドリルアミン樹脂、メチルベンズヒドロキシリルアミン樹脂、アミノメチルフェノキシメチル樹脂、およびDMBHA樹脂は、結合後、開裂することにより直接酸アミドが得られる。収率の観点からすれば、アミノメチル樹脂の使用が好ましい。

【0017】また、カルボキシル基と結合し得る官能基および該カルボキシル基を有するスパーサーとしては、例えばリジンのカルボキシル基をp-カルボキシメチルベンジルエステルに変換し得るものが挙げられる。

【0018】保護アミノ酸とは、官能基を公知の方法により保護基で保護したアミノ酸を意味し、各種の保護アミノ酸が市販されている。本発明のペプチドを合成するには、以下に示す保護基のいずれかを使用するのが好ましい。アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基の保護基としては、Boc（t-ブチルオキシカルボニル）またはFmoc（9-フルオレノメチルオキシカルボニル）；リジンの $\epsilon$ -アミノ基の保護基としては、Z（ベンジルオキシカルボニル）、Cl $\cdot$ Z（2-クロロベンジルオキシカルボニル）、Boc、Npys（3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル）；チロシンの水酸基の保護基としては、Bzl（ベンジル）、Cl $_2$ ·Bzl（2,6-ジクロロベンジル）或いはt-Bu（t-ブチル）であるか、または保護しなくても良い；アルギニンのグアニジノ基の保護基としては、Tos（トシル）、NO $_2$ （ニトロ）、Mtr（4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル）またはPmc（2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル）；グルタミンのカルボキシル基の保護基としては、Bzlエステル、t-Buエステル、cHs（エステルサイクロヘキシルエステル）；グルタミンのアミド基の保護基としては、Trt（トリチル）であるか、または保護しなくても良い；トリプトファンのインドール基の保護基としては、ホルミル基またはBocであるか、または保護しなくても良い。これらの保護基は、ペプチドの合成条件に応じて最も適切なものを、適宜選択して使用することができる。

【0019】保護アミノ酸の結合は、通常の縮合法、例えばDCC（ジクロロヘキシルカルボジイミド）法（Sheehan J., et al.; J. Am. Chem. Soc., 77: 1067, 1955）、DICDI（ジイソプロピルカルボジイミド）法（Tartar, A., et al.; J. Org. Chem., 44: 5000, 1979）、活性エステル法（Fields G., et al.; Int. J. Pept. Protein Res., 35: 161, 1990）、混合或いは対称酸無水物法（Chem. F., et al.; Synthesis, 1978: 928, 1978）、カルボニルジミダゾール法、DCC-HOBT（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）法（Keoni g, W., et al.; Chem. Ber., 103: 788, 1970）、ジフェニルホスホリルアジド法等に従って行うことができるが、なかでもDCC法、DCC-HOBT法、DICDI-HOBT法、対称酸無水物法を使用することが好ましい。これらの縮合反応は、通常、ジクロロメタンやジメチルホルムアミドなどの有機溶媒、またはそれらの混合液中で行われる。尚、 $\alpha$ -アミノ基の保護基の脱離試薬としては、トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン、HC1/ジジオキサン、ピペリジン/ジメチルホルムアミドな

どが用いられ、使用する保護基の種類により適宜選択することができる。また、合成の各段階における縮合反応の進行の程度は、ニンヒドリン反応法(E. Kaiser, et al, Anal. Biochem., 34: 595, 1970)により確認することができる。

【0020】この様にして、上式で表されるアミノ酸配列を有する保護ペプチド樹脂を得た後、不溶性樹脂およびアミノ酸の保護基を脱離させることにより、所望のペプチドを得ることができる。具体的には、例えば、不溶性樹脂としてアミノメチル樹脂誘導体を用いた場合には、適当な溶媒中にてアンモニアで処理することにより該樹脂を脱離させた後、フッ化水素で処理すれば良い。また、不溶性樹脂としてベンズヒドリルアミン樹脂やDMBHA樹脂(Funakoshi, S., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 198: 382, 1988)を用いた場合には、フッ化水素、TFMSA(トリフルオロメタンスルホン酸)、TMSOTf(トリメチルシリルトリフルラート)、またはTMSBr(トリメチルシリルブロミド)等で処理することにより、該樹脂および保護基を同時に脱離させることができる。

【0021】この様にして得られたペプチドは、各種クロマトグラフィー(ゲル濾過、イオン交換、分配、吸着、逆相)、電気泳動、限外濾過等の公知手段により単

離精製することができる。

【0022】また本発明では、上記ペプチドを遺伝子組換え法によって得られる類似蛋白質(抗体、CD4、酵素などの活性中心や結合ドメイン)で置換させたものも、本発明のペプチドとして用いることができる。例えばヒト型抗gp120抗体を遺伝子組換え法により製造する場合には、米国特許第114632号に記載の方法に準じて、ヒトイムノグロブリンのV遺伝子領域中、エピトープの認識に関係していると言われているVH31から35番までのCDR(complementarity determination region)-1の全領域、CDR-2のVH50から52番まで、及び/又はCDR-2のVH58から60番までの3つの超可変群(Hypervariablecluster)のアミノ酸(Ohno, S., Mori, N. & Matunaga, T.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82, 2945(1985))に、上記本発明のペプチドを導入する等すればよい。

【0023】この様に上記本発明のペプチドを、その目的に応じて遺伝子組換え法により置換させることにより、gp120結合型の蛋白質を作製することができる。本発明の具体例としては、例えば下記のものが挙げられる。

【0024】

【表1】

		A1	A2	A3	R
1	H	Asp	Val	Lys	OH
2	H	Asn	Val	Lys	OH
3	H	Glu	Val	Lys	OH
4	H	Gln	Val	Lys	OH
5	H	Ser	Val	Lys	OH
6	H	Met	Val	Lys	OH
7	H	Cys	Val	Lys	OH
8	H	Val	Val	Lys	OH
9	H	Thr	Val	Lys	OH
10	H	Ile	Val	Lys	OH
11	H	Asp	Asp	Lys	OH
12	H	Asp	Phe	Lys	OH
13	H	Asp	Trp	Lys	OH
14	H	Asp	Val	Arg	OH
15	H	Asp	Val	Asp	OH
16	H	Val	Val	Asp	OH
17	H	Lys	Val	Asp	OH
18	H	Asp	Val	Asn	OH
19	H	Asp	Val	Glu	OH
20	H	Asp	Val	Gln	OH
21	H	Asp	Val	Tyr	OH
22	H	Asp	Val	Phe	OH
23	H	Asp	Val	Trp	OH
24	H	Asp	Val	His	OH
25	H	Asp	Val	Ser	OH
26	H	Asp	Val	Thr	OH
27	H	Asp	Val	Cys	OH
28	H	Gly Asp	Val	Lys	OH
29	H	Gly Gly Asp	Val	Lys	OH
30	H	Asp	Lys	Val	OH
31	H	Asp	Asp	Val	OH
32	H	Val	Lys	Lys	OH
33	H	Lys	Val	Val	OH
34	H	Val	Lys	Val	OH
35	H	Val	Ile	Asp	OH
36	H	Val	Leu	Asp	OH
37	H	Gly	Val	Lys	OH
38	H	Asp	Asp	Asp	OH
39	H	Lys	Asp	Asp	OH
40	H	Val	Asp	Asp	OH

【0025】式中の各アミノ酸記号は、国際的に認められた三文字表示によるアミノ酸残基を示すものであり、その詳細は下記の通りである。

Tyr:チロシン  
Lys:リジン  
Trp:トリプトファン  
Arg:アルギニン  
Glu:グルタミン酸  
Gln:グルタミン  
Val:バリン  
His:ヒスチジン  
Ala:アラニン  
Phe:フェニルアラニン  
Gly:グリシン  
Met:メチオニン  
Asp:アスパラギン酸  
Asn:アスパラギン  
Val:バリン

Ser:セリン  
Cys:システイン  
Thr:トレオニン  
Ile:イソロイシン  
Leu:ロイシン

【0026】このようなアミノ酸配列を有するペプチドは、gp120に対して優れた親和性を有しており、以下に示す化合物または組成物の形態をとることによって、抗HIV剤として有効に用いることができる。

【0027】本発明の化合物は、上記ペプチドに、官能基を有する高分子化合物及び／又は医薬活性物質が結合したものであり、医薬として許容されるその塩類も本発明のなかに包含される。ここで、「医薬として許容される塩類」としては、例えば以下の様な常用の無毒性の塩類が挙げられる。

【0028】①無機塩基等の塩基との塩として、アルカリ金属塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩

等)、アンモニウム塩; ②有機塩基塩等の塩基との塩として、有機アミン塩(例えばトリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩等); ③無機酸等の酸との塩として、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸等; ④有機酸等の酸との塩として、有機カルボン酸(酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、サリチル酸等)、有機スルホン酸(メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等)、酸性糖(グルクロン酸、ガラクトン酸、グルコン酸、アスコルビン酸等)。

【0029】また、本発明に用いられる「官能基を有する高分子化合物」は、本発明のペプチドと結合することのできる官能基を有するものであれば特に限定されないが、例えば以下のものが挙げられる。

【0030】(1) 合成高分子化合物

上記高分子化合物としては、直鎖状ポリマー、分岐状ポリマー、環状ポリマーなど任意のものが用いられ、例えばポリリジン、ポリグルタミン酸等のアミノ酸ホモポリマー、或いは環状ポリアミン、サイクロデキストリン、環状ペプチドの他、ポリスチレン、ポリプロピレン、ナイロン、シリカゲル、ポリエチレングリコール、セルロース、ポリアクリルアミドなどの不溶性の固相担体を使用することができる。

【0031】このうち分岐状ポリマー(ブランチドポリマー)は、ポリマー中の分子の一部が分岐することにより、単位当たりの官能基濃度が、通常の直鎖状ポリマーよりも高いものである。例えばDenkewalter により開示されたリジンコアなどの様に、少なくとも2個以上の官能基を有するコア分子に由来する2本以上の同一分子鎖に基づくポリマー(米国特許No. 4, 289, 872号)、或いはトマリア(D. A. Tomalia)らによって提唱されている同一分子が連続的に反応することによりポリマーサイズが厳密な規則性を有するスターバーストデンドリマー(Starburst dendrimer)の様なものであっても良いし、或いは、同一/異なった分子が不連続に反応することによりサイズが不規則に形成された分子であって構わない。また、上記直鎖状/分岐状ポリマーは、十分な大きさを有する担体分子である必要はなく、通常はコアとは認識されない様な3個程度のモノマーを含むものも包含され、その大きさや導入数によって何ら制限されるものではない。但し、上式のペプチドを多数導入させる場合には、いずれのポリマーであっても、分岐数が多いポリマーの使用が推奨される。本発明のペプチドを上述したポリマーに結合させるに当たっては、分岐した官能基からそのまま直接的/間接的に、上記ペプチドを合成して伸長させても良いし、或いは、別途新規に合成したペプチドを、該ポリマーの官能基に直接的/間接的にコンジュゲートしても良い。

【0032】また、環状ポリアミン、サイクロデキストリン、環状ペプチド等の環状ポリマーを結合させるに当たっては、その同一官能基から上式のペプチドを直接合成して伸長させても良いし、或いは、別途新規に合成したペプチドを、該環状ポリマーの官能基に直接的/間接的に結合させても良い。また、シリカゲルなどの不溶性担体を結合させるに当たっては、予め同一官能基を上記担体に導入した後、その官能基から直接上式のペプチドを合成して伸長させても良いし、或いは、別途新規に合成したペプチドを、該不溶性担体の官能基に直接的/間接的にコンジュゲートしても良い。また、この同一官能基を有する担体の大きさや形状は特に限定されず、球状、中空糸状、繊維状等の形状のものを使用目的により適宜選択して使用すれば良く、大きさや形状、導入された官能基の数によって何ら制限されるものではない。

【0033】(2) 生体高分子

上記生体高分子としては、例えばヘパリン、ヒアルロン酸、キトサン、キチン等の直鎖状多糖類; プロテオグリカン類、ペプチドホルモン; セラチン、アルブミン、抗体、抗体断片などのタンパク質等が挙げられる。

【0034】このうち直鎖状ポリマーの大きさは、使用目的に応じて適宜選択すれば良く、通常はポリマーとは認識されない様な3個程度のモノマーを含むものも包含され、その大きさや官能基の数によって何ら制限されるものではない。上式のペプチドをこの直鎖状ポリマーに結合させるに当たっては、その同一官能基から上記ペプチドを直接合成して伸長させても良いし、或いは、別途新規に合成したペプチドを、該直鎖状ポリマーの官能基に直接的/間接的にコンジュゲートしても良い。

【0035】また、ペプチドホルモンやタンパク質を結合させる場合には、上式のペプチドのいずれか末端にシステインを結合させて、上記ペプチドホルモン/タンパク質中のシステイン残基とS-S結合させるか、或いは、上式のペプチドの官能基とペプチドホルモン/タンパク質中の官能基を直接的/間接的にコンジュゲートしても良い。この様に、これらの結合方法は、使用目的に応じて適宜選択することができるし、また、その種類や上式のペプチドの導入数にしても同様である。

【0036】また、本発明に用いられる医薬活性物質としては、例えば抗HIV阻害剤として知られているヌクレオシド誘導体のAZT、HIVプロテアーゼ阻害剤として知られている3,4-Dihydroxy-2,5-di-(N-methyl-(2-pyridylmethyl)carbamoyl)valylamino]-1,6-diphenylhexane等があげられる。これらの医薬活性物質は、本発明のペプチドの活性部位を避けて直接的/間接的にコンジュゲートすることにより、副作用がなく、HIVに特異的な製剤を得ることができる。従って、この様な製剤は、HIVを特異的に治療することのできる治療剤として有用である。

【0037】更に、上述した本発明のペプチドまたは医

薬として許容されるその塩類、並びに薬学的に許容される担体及び／又は医薬活性物質を含有する組成物も本発明の範囲内に包含される。

【0038】上記の「薬学的に許容される担体」としては、賦形剤（崩壊剤、滑沢剤、増量剤等）、着色料、着香料、保存料、安定剤、その他常用の担体を適宜使用することができる。具体的には、結晶セルロース、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、軽質無水ケイ酸、食用色素、芳香性精油類等が挙げられる。

【0039】以下実施例に基づいて本発明を詳述する。ただし、下記実施例は本発明を制限するものではなく、前・後記の趣旨を逸脱しない範囲で変更実施することは全て本発明の技術範囲に包含される。

#### 【0040】

##### 【実施例】

合成例1：本発明ペプチドにサイクロデキストリンを結合させた化合物

サイクロデキストリンの水酸基に無水コハク酸を反応させることによりカルボキシル基を導入した後、MBS（*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミド）と反応させることにより、マレイミド化したサイクロデキストリンを合成した。

【0041】一方、前記表1におけるNo. 1のペプチドのC末端にシステインをペプチド結合させたペプチドを固相合成法で合成した後、得られたペプチドと、上記のマレイミド化したサイクロデキストリンを反応させることにより環状生成物を得た。

【0042】合成例2：本発明ペプチドにポリリジンに結合させた化合物

ポリリジンをGMBS（*γ*-マレイミドブチロキスクシンイミドエステル）と反応させることにより、マレイミド化したポリリジンを合成した。一方、前記表1におけるNo. 1のペプチドのC末端にシステインをペプチド結合させたペプチドを固相合成法で合成した後、得られたペプチドと、上記のマレイミド化したポリリジンを反応させることにより環状生成物を得た。

【0043】合成例3：本発明ペプチドにAZTを結合させた化合物

ブロモ酢酸にクロロギ酸イソブチルを反応させて混合無水物とした後、これをAZTの水酸基と反応させてエステル化することによりブロモアセチルエステル-AZTを合成した。

【0044】一方、前記表1におけるNo. 1のペプチドのC末端にシステインをペプチド結合させたペプチドを固相合成法で合成した後、得られたペプチドと、上記のブロモアセチルエステル-AZTを反応させることにより、該ペプチドとAZTの架橋生成物を得た。

【0045】合成例4：ペプチドとサイクロデキストリンの架橋物にAZTを結合させた包接化合物

リン酸緩衝液（pH 7.5）中にAZTを懸濁させた後、合成例1の化合物（ペプチドとサイクロデキストリンの架橋物）を加えて充分攪拌してAZTを溶解させることにより、該化合物をAZTに包接させた包接化合物を得た。

【0046】実施例1：解離定数（K<sub>d</sub>）の算出

本実施例では、前記表1におけるNo. 1のペプチドを使用し、gp120に対する親和性を、Scatchard が考案したプロット法に準じて解離定数K<sub>d</sub>を算出することにより評価した。

【0047】先ず、このペプチドを臭化シアン活性化セファロース（ファルマシア社製）に標識し、1μmol/mLに調整した。次いで、リン酸緩衝液（pH 7.4）で平衡化した後、該ペプチド標識セファロースを100μLずつマイクロチューブに分注した。

【0048】次に、種々の濃度に調製した西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識gp120 [ImmunoDiagnostics, Inc. 社製；リン酸緩衝液（pH 7.4）] を500μL添加して充分に混和した後、遠心することにより遊離のHRP標識gp120を除去した。更に、0.3%のTween 20を含むリン酸緩衝液により繰り返し洗浄した後、定法に従って基質を添加し、吸光度を測定することにより、ペプチドに結合したgp120の量を算出した。本実施例により得られたScatchard プロットを図1に示す。同図より、No. 1のペプチドの解離定数は $1.00 \times 10^{-10}$  Mであった。

【0049】実施例2：中和活性の測定

本実施例では、前記表1におけるNo. 8, 11, 31, 32, 34及び38のペプチドを使用し、HIV-1株に対する中和活性を調べた。具体的には、96ウェルのマイクロプレート中に、上記ペプチドを50μL；ウイルス液として、No. 8, 11, 31, 34及び38のペプチドの場合には200TCID<sub>50</sub>のHTLV-III B（実験室株）、No. 32のペプチドの場合には200TCID<sub>50</sub>のKK-1株（新鮮分離株、大竹徹ら、感染症雑誌、64, 1284-1294, 1990）をそれぞれ50μL；および正確に段階的に2倍希釈した上記ペプチドを50μL加えて混合した。尚、陽性対照としてはAZTを使用した。

【0050】37℃で30分間反応させた後、更に $3 \times 10^4$ 個のMT-4細胞浮遊液を100μL加え、湿度98%、5%CO<sub>2</sub>の存在下にて37℃で6日間培養した。培養後、HIV-1の増殖による細胞変性効果（CPE）、即ち、薬剤を段階的に希釈して加え、感染した細胞が集合してアイランドを形成する状態（フォーカス形成）になったとき、この希釈倍率の前段階を中和活性量（感染阻止濃度）として判定した。この結果を表2に示す。



【0051】

【表2】

本発明例	中和活性 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
8	31.3
11	62.5
31	500
*32	15.6
34	125
38	1000
AZT	0.0078

\*は、KK-1株に対する中和活性を示し、それ以外は、HTLV-III B株に対する中和活性を示す。

【0052】表2の結果から明らかな様に、本発明のペプチドはいずれも、HIV-1株に対して優れた中和活性を示すことが分かった。このうちNo.32は、実験室株ではなく新鮮分離株を使用した例であるが、この場合にも優れた中和活性が認められることから、本発明のペプチドは、実験室レベルを超えた実用レベルでも極めて有用であることが示唆される。

## 【0053】実施例3：凝集試験

本実施例では、表1のNo.1～7、9、10、12～30、33、35～37、39、40のペプチドを使用し、gp120に対する親和性を凝集試験により評価した。

【0054】1%活性化ラテックスビーズ (Polyscienc 社製、粒子径0.2 $\mu\text{m}$ ) 懸濁液およびアビジン (10 $\text{mg}/\text{mL}$ ) を等量混和した後、37℃で1時間反応させた。反応終了後、ウシ血清アルブミン (BSA、1 $\text{mg}/\text{mL}$ ) を加え、未反応活性部位のブロック化を37℃で30分間行った。次いで、遠心操作を繰り返すことにより未反応物を除去した後、ビオチニル化させた各ペプチド (10 $\text{mg}/\text{mL}$  のリン酸緩衝液、pH 7.5) を添加し、37℃で1時間反応させることにより、抗gp120凝集検査試薬を得た。

【0055】陽性対照としては、バキュロウイルスで発現させたリコンビナントgp120を標識した金コロイド (Immuno Diagnostics, Inc. 社製、粒子径30 $\text{nm}$ )

を使用し、一方、陰性対照には、該当するリコンビナントgp120をリン酸緩衝液に溶解したものを使用した。

【0056】凝集板に、上記凝集検査試薬と陽性対照を夫々20 $\mu\text{L}$ ずつ加えて混和し、10分間静置した後、肉眼で凝集の有無を判定した。尚、本実施例では、陽性対照の代わりに陰性対照を使用した場合には、凝集は見られなかったことを確認している。その結果、本発明のペプチドはいずれもgp120に対して親和性を有することが確認された。

## 【0057】実施例4：HIV吸着カラム (血清中のgp120の除去)

本実施例では、表1のNo.1のペプチドを結合させたカラムを用いて、gp120に対する吸着性を検討した。固相合成されたNo.1のペプチドのC末端側を、ペプチドからなるスパーサーを介してCNBr-活性化Sepharose 4Bに共有結合させた担体 (50 $\text{nmol}/\text{mL}$ ) を作製し、これをポリプロピレン製カラム (10 $\text{mL}$  容量) にベッド容量で1 $\text{mL}$  充填した。尚、カラムは、予め37℃に調整された恒温器の中で加温しておいた後、同温度に保たれた0.1%BSAおよび0.3%Tween 20含有ダルベッコのリン酸緩衝液 (pH 7.4) 300 $\text{mL}$  により十分に平衡化させたものを使用した。

【0058】一方、カラム添加試料として、西洋ワサビ由来のパーオキシダーゼ (HRP) を標識したgp120 (イムノダイアグノスティック社製、USA) を、予め37℃に加温しておいた牛胎児血清 (FCS) で希釈して0.3 $\text{nM}$  に調整したものを用意した。また、対照試料として、FCSで1 $\text{nM}$  に調整されたHRPを用意した。

【0059】これらの試料を上記カラムに通した後、このカラムを上記緩衝液で十分に洗浄した。洗浄液に未反応の試料が残存しないことを確かめた後、このカラムに酵素基質液を加えて発色させ、比色定量後、HRP標識gp120量を算出した。その結果を表3に示す。

## 【0060】

【表3】

		添加試料	gp120 / HRP 量 ( $\text{nM}$ )	吸着率 (%)
対照	開始試料	0.3 $\text{nM}$ HRP-gp120 / FCS	0.26	100
		1 $\text{nM}$ HRP / FCS	1.00	100
カラム外	素通り画分	0.3 $\text{nM}$ HRP-gp120 / FCS	0	0
		1 $\text{nM}$ HRP / FCS	0.98	98
カラム内	担体結合画分	0.3 $\text{nM}$ HRP-gp120 / FCS	0.25	96.2
		1 $\text{nM}$ HRP / FCS	0	0

【0061】カラム添加試料として、1 $\text{nM}$  HRP / FCSを用いたときはカラムへの吸着は全く見られなかつたのに対し、0.3 $\text{nM}$  HRP-gp120 / FCSを用いると、カラムへの吸着は概ね100%見られた

ことから、本発明のペプチドは、gp-120に対して特異的に吸着することが分かった。

【0062】実施例5：高压滅菌による親和性への影響  
実施例4で調製したNo. 1のペプチドを共有結合させた Sepharose 4B充填カラムにダルベッコのリン酸緩衝液を十分に満たした後、121℃で30分間、高压滅菌をかけた後、HRP標識gp120を用いて解離定数を求めた。同様にNo. 16および17のペプチドについても高压滅菌処理して解離定数を求めた。尚、対照として、高压滅菌をかけていないカラムを同様に用意し、比較検討した。その結果を表4に示す。

【0063】

【表4】

本発明例	解離定数 (M)	
	未処理	高压滅菌処理
1	$1.36 \times 10^{-10}$	$3.00 \times 10^{-10}$
16	$7.40 \times 10^{-10}$	$3.20 \times 10^{-10}$
17	$1.77 \times 10^{-9}$	$5.98 \times 10^{-9}$

【0064】表4より、本発明のペプチドはいずれも、高压滅菌処理によっても結合能の低下が全く見られなかった。

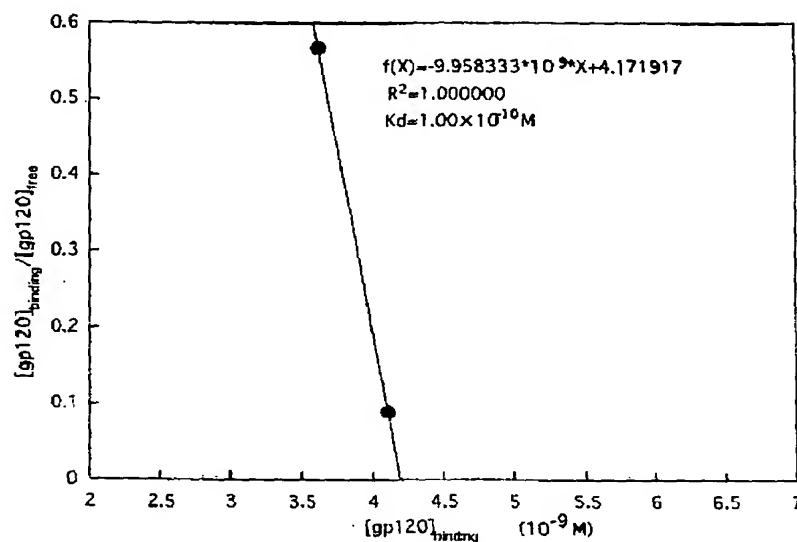
【0065】

【発明の効果】本発明のペプチドは、gp120に対して親和性を有するものであり、従来の抗体分子に匹敵するだけの中和活性を持った抗HIV剤として、その凝集能を用いたHIV診断薬として、更には、抗体分子にない物理的な安定性を活用した、高压滅菌を必要とするHIV除去用デバイス等の医療用具として、極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られたScatchard プロットの結果を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

FI

C 0 7 K 17/08

C 1 2 P 21/02

C

17/10

A 6 1 K 39/395

D

C 1 2 P 21/02

39/42

// A 6 1 K 39/395

37/02

ABD

( 1 1 )

特開平10-182695

39/42

ADY

